## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号: 14501 研究種目: 基盤研究(C) 研究期間: 2012~2014

課題番号: 24592026

研究課題名(和文)癌幹細胞マーカーCD133に着目した胆道癌の抗癌剤耐性解明と新規治療への応用

研究課題名(英文)Study of resistant mechanism to chemotherapeutic agents of CD133 expression in biliary tract cancers

研究代表者

味木 徹夫 (AJIKI, TETSUO)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号:80379403

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文): 胆道癌に対する集学的治療は抗癌剤が中心であるが、その奏効率は低い。この理由として癌幹細胞の関与を仮説とし、研究を行なった。癌幹細胞マーカーCD133に着目し、胆道癌での発現を検討すると、高悪性度の胆管癌では、約20%の癌細胞に発現を認めるのに対し、低悪性度の胆管内乳頭状腫瘍(IPNB)では全く発現が見られなかった。また、抗癌剤投与後に癌が縮小し、手術可能となった症例を検討すると、遺残癌細胞では約80%にCD133の発現を認めた。これらは、CD133発現が胆道癌の悪性度や抗癌剤耐性に重要であることを示した。また、CD133発現陽性、CD133発現陰性の胆道癌細胞株の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文): Systemic chemotherapy is usually indicated for patients with advanced biliary tract (BT) cancer, but response rates of chemotherapeutic agents for this tumor is quite low. We hypothesized that the low response rate is related to the existence of cancer stem cells. We examined CD 133 expression, a cancer stem cell marker, in biliary tract cancers. While no CD133 expression was observed in IPNB (low malignant tumor of BT) tumor, about 20% of cancer cells in conventional bile duct cancer cells expressed CD133. Moreover, about 80% of cancer cells of resected BT cancer cases after chemotherapy showed CD 133 expression. These results indicated that CD133 expression might be highly related to malignant potential of BT cancers or the resistance to the chemotherapeutic agents. In addition, we successes establishments both of CD133 positive and CD133 negative cancer cell lines from resected BT cancer cases.

研究分野: 消化器外科学

キーワード: 胆道癌 癌幹細胞 CD133

#### 1.研究開始当初の背景

胆道癌は近年増加し、日本人の死因の第6位となっているが、5大癌や膵癌と比べ、癌対策は遅れている。胆道癌に対する有効な治療法は、現在外科手術であるが、その根治切除率は約60%で、切除後再発率も高い。一方、胆道癌に対する集学的治療は抗癌剤が中心である。しかし、認可抗癌剤(GEM, S-1)の奏効率は約20%と低い。このため、新規治療の開発が望まれている。

抗癌剤が奏効しない理由の1つに、癌幹細胞の関与、特にそのdormancyが重要であると考えられている。実際、悪性度の高い膵癌では、癌幹細胞マーカーであるCD133が高発現しているが、低悪性度の膵管内乳頭粘液産生腫瘍ではCD133の発現が見られないことを我々は近年明らかにした(Shimizu K, Hori Y, et al, Pancreas, 38 e207-214, 2009)。 膵癌と胆道癌には生物学的特性の共通点が多く見られることから、胆道癌でも癌幹細胞に着目した新規治療の可能性が考えられた。

## 2.研究の目的

胆道癌に対する抗癌剤奏効例が少ない理由を、癌幹細胞の発現からみて分子レベルで究明し、これらを応用して新規治療の開発を目指すことである。

具体的な目的としては、以下を設定した。 (1) CD133 陽性癌幹細胞株の樹立

- (2) 胆道癌症例 (抗癌剤治療例を含む) における CD133 発現解析
- (3) 樹立癌細胞株の胆道癌同所性移植モデルでの分子生物学的病態解析

#### 3.研究の方法

#### (1) CD133 陽性癌細胞株の樹立

膵癌では Gemcitabine (GEM) 治療を行った患者の肝転移巣や癌性胸・腹水から無菌的に細胞分画を精製、この細胞分画を無血清培地下で PA6 feeder 細胞と共培養行うことでコロニーが形成された。このコロニーを形成する細胞株はいずれも CD133 を高発現し、ヌードマウスの膵臓に移植することで、ヒト膵癌と同様の腺癌を形成した。CD133 陽性細胞株の自己複製には feeder 細胞との細胞間接着が必要であった。これに反し、抗癌剤未治療の患者からは CD133 陽性細胞株が樹立できなかった (Shimizu K, Hori Y, et al, PLos One 8, 2013)。これら、膵癌での細胞株樹立と同様の手法を用い、胆道癌におけるCD133 陽性細胞株の樹立を図った。

# (2) 胆道癌症例 (抗癌剤治療例を含む)における CD133 発現解析

免疫組織化学染色法にて CD133 タンパク 発現を検討した。 CD133 発現は apical staining の形態をとり、肝 Hering 管を internal positive control とした。

## (3) 樹立癌細胞株の胆道同所性移植モデルで

#### の分子生物学的病態解析

独自に開発したヌードマウス胆嚢癌同所性移植モデルを用いて(Mita Y, Ajiki T, et al, Ann Surg Oncol, 14, 1374-80, 2007)、樹立細胞株を移植し、抗癌剤 GEM 投与の有効性を判定する。GEM 治療前、治療後に変化する因子に関し、タンパクレベル、遺伝子レベルでの解析を行なう。

#### 4. 研究成果

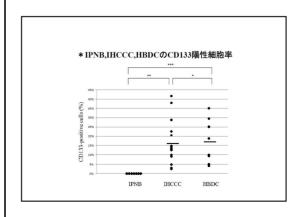
## (1) CD133 陽性癌細胞株の樹立

PA6 feeder 細胞を敷き詰めた環境で、20 例の胆道癌(胆嚢癌、胆管癌)の初代培養を試みた。術前に化学療法を施行されなかった19 例では 1 例のみが初代培養が可能であった。一方、術前に GEM 抗癌剤治療を行なった胆嚢癌切除例 1 例は初代培養に成功した。この結果は、膵癌と同様に、抗癌剤投与後であることが癌細胞株の初代培養に関連することが示唆された。さらに、培養条件を検討すると、CD133 発現陽性細胞株の樹立には、feeder 細胞が有る事、無血清培地であること、抗癌剤投与後が重要と考えられた。

一方で、CD133の発現の無い胆管内乳頭状腫瘍(Intraductal papillary neoplasm of the bile duct, IPNB)例で、同様の方法を用いて、初代培養に成功し、細胞株の樹立にいたった(KBDC-11, Murakami S, Ajiki T, et al, Anticancer Res, 34, 2203-10, 2014)。これはPA6 feeder cell との共培養に伴う結果である可能性が高く、PA6 feeder cell の役割については、さらに検討が必要である。

## (2) 胆道癌症例 (抗癌剤治療例を含む) における CD133 発現解析

免疫組織化学染色法で高悪性度の胆管癌24 例(肝内16 例(IHCCC) 肝外8 例(HBDC))と低悪性度のIPNB7例を対象にCD133 発現を検討した。IPNB7例ではCD133 発現を全く認めず、肝内胆管癌では16.4%の癌細胞に、肝外胆管癌では17.2%の癌細胞にCD133高発現を認めた。この結果は、膵癌、膵IPMNのCD133発現の結果と極めて類似していた(OhtsuboI, AjikiT, et al, Hepato Res, 42, 547-82, 2012)。



次に抗癌剤投与が奏効し、切除不能例が結果的に切除にいたった胆囊癌症例につきCD133発現を検討した。抗癌剤投与後の切除材料では、CD133発現癌細胞は80.9%と極めて高い値を示した。この結果は、抗癌剤耐性を示すCD133陽性細胞の部分が、組織学的にviableな部分として遺残、増殖した結果と考えられた(村上、味木、他、癌と化学療法、40,1744-6,2013)。

## (3) 樹立癌細胞株の胆道同所性移植モデルで の分子生物学的病態解析

CD133 発現陽性樹立細胞および、CD133 発現陰性樹立細胞(KBDC-11)のヌードマウ ス移植が可能であることを確認した。抗癌剤 治療前後に変動する因子に関しては、現在研 究中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

#### 〔雑誌論文〕(計5件)

Ohtsubo I, <u>Ajiki T</u>, <u>Hori Y</u>, Murakami S, Shimizu K, Itoh T, Shimizu M, Fukumoto T, <u>Ku Y</u>. Distinctive expression of CD133 between intraductal papillary neoplasms of the bile duct and bile duct adenocarcinomas. Hepatol Res, 查読有、42, 2012, 574-582.

村上 冴、<u>味木 徹夫</u>、篠崎 健太、吉田 優子、大坪 出、岡崎 太郎、後藤 直大、浅利 貞毅、新関 亮、木戸 正浩、松本 逸平、福本 巧、<u>具 英成</u>. 切除不能胆囊癌に対し化学療法施行後に切除を施行した 1 例. 癌と化学療法、査読有、40, 2013, 1744-1746.

Murakami S, <u>Ajiki T, Hori Y</u>, Okazaki T, Fukumoto T, <u>Ku Y</u>. Establishment of a novel cell line from intraductal papillary neoplasm of the bile duct. Anticancer Res, 查読有, 34, 2014, 2203-2209.

<u>味木 徹夫</u>、岡崎 太郎、村上 冴、吉田 優子、篠崎 健太、大坪 出、松本 逸平、福本 巧、<u>具 英成</u>. 非切除胆道癌に対し化学療法施行後に切除に至った症例の検討. 癌の臨床、査読有、58, 2012, 273-279.

村上 冴、<u>味木 徹夫</u>、岡崎 太郎、松本拓、吉田 優子、篠崎 健太、後藤 直大、浅利 貞毅、新関 亮、木戸 正浩、松本 逸平、福本 巧、<u>具 英成</u>. 肝内胆管癌再発例に対する再切除の可能性. 癌と化学療法、査読有、41,2014,1468-1470.

## [学会発表](計6件)

村上 冴、<u>味木 徹夫</u>、堀 裕一、篠崎 健 太、吉田 優子、大坪 出、岡﨑 太郎、松本 逸平、福本 巧、<u>具 英成</u>: 粘液産生胆管腫瘍 (IPNB)からの細胞株樹立、第 113 回日本 外科学会、2013. 4.11、博多(福岡県)

味木 徹夫、村上 冴、岡崎 太郎、大坪出、吉田 優子、篠崎 健太、<u>堀 裕一</u>、松本 逸平、新関 亮、木戸 正浩、福本 巧、<u>具 英成</u>: 癌幹細胞マーカーCD133 の発現からみた IPNB と膵 IPMN の類似性、第 25 回日本肝胆膵外科学会、2013. 6.14、宇都宮(栃木県)

味木 徹夫、岡崎 太郎、村上 冴、吉田優子、篠崎 健太、松本 拓、松本 逸平、新関 亮、浅利 貞毅、木戸 正浩、福本 巧、具 英成:非切除振興・再発胆道癌に対する2次治療としてのS-1投与の役割、第51回日本癌治療学会、2013.6.14、京都(京都府)

味木 徹夫、岡崎 太郎、村上 冴、吉田優子、篠崎 健太、松本 拓、松本 逸平、新関 亮、浅利 貞毅、後藤 直大、木戸 正浩、福本 巧、<u>具 英成</u>:非切除進行、再発胆道癌に対する GEM、S-1 段階的治療の成績、第 100 回日本消化器病学会、2014. 4.26、東京(東京都)

味木 徹夫、上野公彦、沢 秀博、大坪 出、村上 冴、吉田 優子、篠崎 健太、木戸 正浩、新関 亮、外山 博近、松本 逸平、<u>堀 裕</u>二、福本 巧、<u>具 英成</u>:非切除胆道癌に対し化学療法施行後に切除に至った症例の検討、第 112 回日本外科学会、2012. 4.12、千葉(千葉県)

味木 徹夫: 膵胆道癌幹細胞に着目した抗癌剤耐性解明と新規治療法の開発、第4回次世代シグナル伝達医学グローバル COE 研究討論会、2012.7.9、淡路島(兵庫県)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕 ホームページ等

- 6. 研究組織
- (1)研究代表者

味木 徹夫 (AJIKI, Tetsuo)

神戸大学・医学部附属病院・特命教授 研究者番号:80379403

## (2)研究分担者

堀 裕一(HORI, Yuuichi) 神戸大学・保健学研究科・教授 研究者番号: 80248004

具 英成 (GU, Eisei) 神戸大学・医学研究科・教授 研究者番号: 40195615